

VU Research Portal

Molecular mechanisms of resistance to classical and experimental anti-rheumatic drugs

Oerlemans, R.

2010

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Oerlemans, R. (2010). *Molecular mechanisms of resistance to classical and experimental anti-rheumatic drugs*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

Reumatoïde artritis (RA) is een chronische ontstekingsziekte die in Nederland ongeveer 1% van de bevolking treft. De ziekte wordt vooral gekenmerkt door een ontsteking van de gewrichten met zwelling, roodheid en pijn van de aangedane gewrichten tot gevolg. Uiteindelijk zal de chronische ontsteking de gewrichten aantasten en leiden tot ernstige invaliditeit, immobiliteit, vermindering van de kwaliteit van leven en van levensverwachting. Omdat RA een veel voorkomende chronische aandoening is, heeft de ziekte ook grote sociaal-economische gevolgen met hoge kosten voor de gezondheidszorg. De hedendaagse behandeling van RA bestaat uit snelle en agressieve interventies met chemische en biologische disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs). Door gebruik van deze geneesmiddelen wordt een langdurige onderdrukking van de ziekte nagestreefd en idealiter volledige remissie, genezing is echter nog niet mogelijk. Om deze reden worden er wereldwijd continu inspanningen geleverd om de achtergrond van het ziekteproces te onderzoeken en met deze kennis nieuwe therapieën voor de behandeling van RA te ontdekken en te evalueren.

Hoewel de precieze oorzaak van RA nog niet is opgehelderd, is het wel duidelijk dat er meerdere risicofactoren gekoppeld zijn aan het ontstaan van RA (**hoofdstuk 1**). Algemeen wordt aangenomen dat een combinatie van een bepaalde gevoeligheid in genetische achtergrond en externe gebeurtenissen (bijvoorbeeld trauma of infecties) kunnen leiden tot een auto-immuun reactie. Bij een auto-immuunziekte is het immuunsysteem ontregeld waardoor het bij het reguleren van een afweerreactie niet voldoende onderscheid kan maken tussen lichaamsvreemde of lichaamseigen componenten. Bij RA wordt op dit moment verondersteld dat het immuunsysteem een component in de gewrichten, mogelijk kraakbeen, herkent als een potentieel gevaar dat afgeweerd moet worden. Dit afweerproces uit zich door een ontstekingsreactie waarbij het immuunsysteem betrokken is. Het immuunsysteem heeft een scala aan celtypes dat hierbij een rol kan spelen; bijvoorbeeld: dendritische cellen (betrokken bij de verwerking en presentatie van antigenen), T-cellen (onder meer betrokken bij de cellulaire afweer door geïnfecteerde cellen op te ruimen), B-cellen (productie van antilichamen na differentiatie tot plasmacel) en monocyten/macrofagen (betrokken bij de fagocytose en verwerken van restanten van cellen en pathogenen). De cellen van het immuunsysteem zijn door de uitscheiding van specifieke hormonaalachtige signaalstoffen, chemokines en cytokines genaamd, in staat om met elkaar te communiceren. Het type signaalstoffen dat door de verschillende cellen wordt uitgescheiden is bepalend voor de soort afweerreactie die in het lichaam plaatsvindt. Binnen het geavanceerde en complexe communicatienetwerk van de ontstekingsreactie wordt

het cytokine Tumor Necrosis Factor α (TNF α) beschouwd als een dominante speler. Bij RA wordt nu algemeen aangenomen dat immuun-effector cellen (macrofagen, dendritische cellen, T-lymfocyten en B-lymfocyten), samen met een ontregelde uitscheiding van ontstekingsgerelateerde cytokines zoals TNF α , van essentieel belang zijn voor het ontstaan en de instandhouding van de ziekte. Daarom is het merendeel van de huidige behandelingen gericht op het onder controle brengen en houden van de ontstekingsreactie en preventie van schade aan botten, hetzij door de uitschakeling van ontstekingscellen, dan wel door ingrijpen in het cytokine/chemokine communicatienetwerk.

Klassieke (en biologische) DMARDs worden voorgeschreven aan patiënten met RA. Deze kleine moleculen/antilichamen kunnen de ontsteking temperen en zijn zelfs in staat om in een deel van de patiënten tijdelijk remissie te induceren. Echter, omdat deze medicijnen niet in staat zijn om de ziekte te genezen, is chronische toediening noodzakelijk om klinische vooruitgang te behouden. Helaas zijn voor veel RA patiënten de therapeutische voordelen van DMARDs slechts tijdelijk. Vaak verliezen DMARDs na chronisch gebruik van een aantal maanden of jaren geleidelijk hun werkzaamheid. Dit proces wordt ook wel verworven resistentie genoemd. Bij een klein deel van de patiënten kan het gebrek aan werkzaamheid al worden waargenomen bij aanvang van de behandeling, dit wordt ook wel primaire of inherente resistentie genoemd. Echter, in de meeste gevallen treedt DMARD-resistentie op na een periode van een initiële goede respons op de therapie. Een extra onderscheid kan nog worden gemaakt tussen resistentie die slechts één klasse DMARDs omvat (bijv. foliumzuur analoga) dan wel juist meerdere DMARDs omvat die chemisch en functioneel van elkaar verschillen. In het laatste geval spreekt men ook van een multidrug-resistent fenotype. Belangrijke vragen zijn hoe patiënten resistentie tegen DMARDs ontwikkelen en wat de onderliggende mechanismen hierbij zijn. Een belangrijk mechanisme waar we ons in dit proefschrift op gericht hebben, is de betrokkenheid van multi-drug resistentie (MDR) pompen (transporters). MDR pompen zijn eiwitten die behoren tot de familie van energie (ATP) afhankelijke ABC-transporteiwitten, die een breed scala aan verschillende stoffen uit cellen kunnen pompen. Er zijn steeds meer aanwijzingen dat verschillende DMARDs substraten zijn voor afzonderlijke MDR eiwitten. Hierdoor kan de aanwezigheid van deze pompen tot een verminderde werkzaamheid van DMARDs leiden. Op basis van deze achtergrond, hebben we besloten om de volgende twee doelstellingen in dit proefschrift verder te onderzoeken:

- 1) Het bepalen van de rol van drug transporters in de ontwikkeling van resistentie/verlies van werkzaamheid van DMARDs bij immuuncellen die een belangrijke rol spelen in de pathofysiologie van RA.
- 2) Het onderzoeken van de werkzaamheid van enkele nieuwe specifieke geneesmid-

delen die de potentie hebben om DMARD-resistentie te omzeilen, hierbij rekening houdend dat ook tegen deze nieuwe geneesmiddelen resistentieontwikkeling kan optreden.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de pathofysiologische aspecten en de huidige behandelingsmethoden van RA. Daarnaast wordt de potentiële rol van drug transporteiwitten in het ontstaan van resistentie tegen DMARDs beschreven. Tot slot worden nieuwe experimentele therapeutische opties voor RA besproken. De aandacht richt zich hierbij vooral op proteasoomremmers, een nieuwe klasse van doelgerichte geneesmiddelen met mogelijke ontstekingsremmende eigenschappen.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de huidige stand van de literatuur met betrekking tot de relatie van MDR transporteiwitten en het immuunsysteem. Deze gegevens onderkennen dat MDR transporteiwitten aanwezig zijn op de meeste immuun-gerelateerde cellen (T-cellen, B-cellen, monocyten/macrofagen en dendritische cellen), met inbegrip van degenen die een rol spelen bij RA. Naast een mogelijke farmacologische rol in het ontstaan van resistentie tegen geneesmiddelen zoals DMARDs, vervullen diverse MDR transporteiwitten ook belangrijke immuun-regulerende functies door het transport van moleculen die fungeren als ontstekingsfactoren (bijv. leucotrienen) en/of betrokken zijn bij differentiatie en uitrijping van immuuncellen. Deze dubbele functie van MDR transporteiwitten en de gevolgen voor zowel patiënten met auto-immuunziekten als met kanker, worden in dit hoofdstuk uitgebreid besproken. Hieruit komen aanwijzingen naar voren dat het blokkeren van de fysiologische functie van MDR transporteiwitten mogelijk de abnormale immuunrespons bij RA patiënten kan afremmen, hetgeen een voordelig effect zou sorteren. Echter, voor kankerpatiënten, bij wie het immuunsysteem vaak verzwakt is, kan het blokkeren van MDR transporteiwitten juist een negatief effect hebben door een verdere onderdrukking van het immuunsysteem.

Het antimalaria geneesmiddel en tevens DMARD (hydroxy) chloroquine (CHQ) heeft een bescheiden maar vaste plaats binnen de behandeling van RA, mede door het gemak waarmee dit middel te combineren is met andere DMARDs. Echter, uit de klinische praktijk blijkt dat CHQ één van de DMARD's is waarvoor een relatief snel verlies van werkzaamheid is gemeld na langdurige toediening. Het mechanisme hierachter is grotendeels onbekend. In **hoofdstuk 3** hebben wij de ontwikkeling van CHQ resistentie nagebootst door een menselijke T-cel lijn *in-vitro* bloot te stellen aan een stapsgewijs toenemende concentratie van CHQ. Door deze methode verkregen we na een periode van 5 maanden cellen die 3 tot 4 maal resistenter waren voor CHQ. Uit onderzoek naar het resistentiemechanisme bleek er in de CHQ-resistente cellen een verhoogde expressie van het multidrug resistentie-geassocieerde transporteiwit 1

(MRP1) aanwezig te zijn. De rol van deze drugtransporter werd verder bevestigd door het blokkeren van MRP1 waarmee de CHQ gevoeligheid hersteld kon worden. CHQ-resistente T-cellen bleven wel volledig gevoelig voor andere DMARDs, waaronder methotrexaat (MTX), leflunomide, cyclosporine A en sulfasalazine. Zeer opvallend was het feit dat CHQ-resistente cellen ook in hoge mate resistent (> 1.000-voudig) bleken voor de glucocorticoïden (GCs) dexamethason en prednisolon tengevolge van een verstoorde cyclisch AMP-afhankelijke proteïne kinase A signaaltransductie route. In overeenstemming hiermee bleek dat een tijdelijke activatie van cAMP-afhankelijke proteïne kinase A de gevoeligheid voor GCs te kunnen herstellen. Ten slotte bleken CHQ-resistente T-cellen ook een opvallende verstoorde capaciteit te hebben om het pro-inflammatoire cytokine TNF- α en het chemokine IL-8 uit te scheiden. Dit wijst erop dat CHQ-resistentie in dit T-cel lijn model niet noodzakelijkerwijs de anti-inflammatoire effecten van CHQ compromitteert.

Inherente of verworven resistentie tegen glucocorticoïden (GCs) is een erkend probleem in de behandeling van (chronisch) inflammatoire aandoeningen en beperkt hiermee hun optimale werkzaamheid. Zoals weergegeven in hoofdstuk 3, was resistentie tegen CHQ geassocieerd met een duidelijke kruis-resistentie tegen GCs. In **hoofdstuk 4** rapporteren we over een tegenovergesteld verschijnsel. Na langdurige blootstelling aan de DMARD sulfasalazine (SSZ) werden twee primair GC-resistente humane monocyttaire/macrofage cellijnen gevoelig voor GCs. Herstel van de GC-gevoeligheid in deze aan SSZ blootgestelde cellen werd verkregen via GC-geïnduceerde apoptotische celdood samen met remming van NF κ B activering. GC-gevoeligheid was ook sterk verbeterd door een aanzienlijke verhoging van het glucocorticoïd receptor α eiwit in SSZ-blootgestelde cellen, waarschijnlijk door een betere stabilisering van het GR α eiwit. Deze resultaten verdienen verder experimenteel onderzoek om potentiële mechanismen te onderzoeken die de klinische activiteit van DMARD-combinatietherapie met methotrexaat, sulfasalazine en prednisolon als onderdeel van de COBRA-protocol voor de behandeling van RA patiënten kunnen verklaren.

De combinatie van DMARDs is tegenwoordig gangbaar in veel behandelprotocollen voor RA. Voor een bepaald type DMARD combinatie, t.w. MTX + SSZ, zijn echter tegenstrijdige resultaten gerapporteerd. Hierdoor is het onduidelijk of deze combinatie een additief/synergetisch effect of een antagonistisch effect sorteert ten opzichte van iedere DMARD afzonderlijk. In **hoofdstuk 5** onderzochten wij of mogelijke geneesmiddelinteracties van invloed zijn op de werkzaamheid van het MTX + SSZ combinatie in een *in vitro* model van menselijke monocyttaire/macrofage cellen. Er konden twee vormen van negatieve interacties van SSZ met MTX worden waargenomen. Ten eerste bleek SSZ een krachtige en niet-competitieve remmer van de gereduceerde

folaat transporter (RFC) te zijn. Dit is de belangrijkste route voor cellulaire opname van MTX. Ten tweede bleek langdurige blootstelling van SSZ een duidelijke verhoogde expressie te induceren van het multidrug transporteiwit ABCG2 (BCRP). Omdat BCRP in staat is MTX uit een cel te transporteren, kan een verhoogde expressie van BCRP bijdragen aan een verminderde werkzaamheid van MTX. Samen hebben deze bevindingen relevante gevolgen voor het optimale gebruik van MTX + SSZ combinaties voor de behandeling van RA. Indien we dit laatste in ogenschouw nemen, kunnen SSZ-RFC interacties niet alleen de cellulaire opname van MTX belemmeren maar mogelijk ook leiden tot een tekort aan natuurlijke folaten in de cel. Deze resultaten pleiten dan ook voor het geven van folaat suppletie en gespreide toediening van SSZ en MTX tijdens behandeling, rekeninghoudend met het gegeven dat de remmende effecten van SSZ op RFC-afhankelijke MTX opname van voorbijgaande aard zijn.

In vitro studies hebben duidelijk aangetoond dat MDR transporters betrokken kunnen zijn bij resistentie tegen verschillende DMARDs. Klinische gegevens waaruit blijkt dat MDR transporters een rol spelen in DMARD resistentie zijn echter schaars. De beperkte klinische studies over dit onderwerp waren voornamelijk gericht op P-glycoproteïne (P-gp), de eerste geïdentificeerde MDR transporter. De mogelijke bijdrage van andere MDR transporters heeft nog weinig aandacht gekregen. Daarom hebben wij in **hoofdstuk 6** het expressie profiel en functionele activiteit van geselecteerde MDR transporters (P-gp, BCRP en MRP1-9) op immuun-gerelateerde cellen van RA patiënten geëvalueerd in relatie tot de klinische respons op DMARDs. Voor dit onderzoek werden perifere bloed lymfocyten (PBLs) en van monocyt afkomstige macrofagen (MDM) verkregen van 52 RA patiënten (inclusief DMARD-naïeve en DMARD-(non) responsieve patiënten) en 19 gezonde vrijwilligers. Met behulp van verschillende technieken zoals real-time PCR, immunohistochemie en flow cytometrie waren we in staat om de aanwezigheid en de functionele activiteit van bovengenoemde MDR transporters te bepalen. Wij toonden aan dat verschillende MDR transporters aanwezig zijn op perifere bloed lymfocyten en MDM bij zowel RA-patiënten als gezonde controles. In perifere bloed lymfocyten van RA patiënten werden verhoogde mRNA niveaus van MRP1 (2.5-voudig), MRP4 (1.6-voudig) en MRP7 (1.9-voudig) waargenomen. In van monocyten afkomstige macrofagen werden aanzienlijk verhoogde niveaus van het BCRP eiwit (2.4-voudig) en BCRP mRNA (2.8-voudig) waargenomen, terwijl P-gp eiwit expressie correleerde met de ziekte-activiteit. In T-lymfocyten van RA patiënten die werden behandeld met DMARDs bleek de activiteit van P-gp significant (1.7-voudig) te zijn verhoogd ten opzichte van DMARD-naïeve patiënten. Daarnaast bleken alleen MRP2 en MRP4 mRNA niveaus te zijn gestegen in DMARD non-responders in vergelijking met DMARD-responders. De resultaten van deze studie suggereren dat een verhoging van specifieke MDR transporters op immuun-gerelateerde cellen van RA patiënten eerder een weerspiegeling

is van de ziekte activiteit dan dat er van een DMARD-geïnduceerd fenomeen sprake is. In beide scenario's echter, kan een toename in de expressie van MDR transporters bijdragen tot een verminderde DMARD respons bij RA patiënten. Naar aanleiding van deze cross-sectionele studie is vervolg onderzoek in een vorm van een longitudinale studie noodzakelijk om het belang van MDR transporters in het ontstaan van het verlies van werkzaamheid van DMARDs verder te bepalen.

Naast de analyse van MDR transporter expressie op perifere bloedcellen (hoofdstuk 6), hebben we ook het ontstoken synoviale weefsel van RA patiënten nader bestudeerd. **Hoofdstuk 7** beschrijft de immunohistochemische analyse van de expressieniveaus van de MDR transporters P-gp, MRP1-5, MRP8, MRP9 en BCRP op inflammatoire cellen in synoviaal weefsel. Dit weefsel was afkomstig van RA patiënten met een actieve ziekte voorafgaand en na 4 maanden behandeling met MTX (7.5-15 mg / week) of leflunomide (20mg/day). Resultaten werden vergeleken met niet-ontstoken synoviaal weefsel afkomstig van orthopedische patiënten. In alle RA synoviale biopoten, zowel voorafgaand en na 4 maanden MTX behandeling, werd een verhoogde expressie van BCRP waargenomen op macrofagen in de intimale laag evenals op macrofagen en endotheelcellen in de synoviale sublining. Statistische analyse toonde een trend aan van een verhoogde BCRP expressie naar mate de ziekte-activiteit hoger was (gedefinieerd door de ziekte-activiteit score gebaseerd op 28 gewrichten/DAS28). Bovendien was de mediane BCRP expressie 4 tot 8 keer hoger voor patiënten die niet reageerden op MTX in vergelijking met patiënten die wel op MTX reageerden. Een vergelijkbare trend werd waargenomen voor RA patiënten die behandeld werden met leflunomide: BCRP expressie was 2.5 maal verhoogd in synoviale biopsieën afkomstig van 'leflunomide-falers' ten opzichte van patiënten met een goede respons op leflunomide. Een lage expressie van MRP1 werd waargenomen op T-cellen van sommige synoviale biopoten, terwijl expressie van P-gp, MRP2-5, MRP8 en MRP9 onder de immunohistochemische detectieniveaus bleven. In controle synoviale weefsel werden slechts kleine aantallen geïnfiltreerde macrofagen waargenomen waarvan een nog kleiner deel positief werd bevonden voor BCRP. De kleuring van de overige MDR-eiwitten was negatief. Omdat macrofagen van alle RA synoviale biopoten al voor de start van de therapeutische interventie een positieve aankleuring lieten zien, lijkt de expressie van BCRP eerder een ontstekingsafhankelijk verschijnsel te zijn dan een geneesmiddel-geïnduceerd effect geassocieerd met het ontstaan van resistentie. Ongeacht dit gegeven, kan BCRP toch een bijdrage leveren aan een verminderde effectiviteit van MTX, leflunomide and sulfasalazine omdat deze DMARDs bewezen substraten zijn voor BCRP.

De directe of indirecte betrokkenheid van MDR transporters in de cellulaire secretie van ontstekings gerelateerde chemokines en cytokines blijft een controversieel

onderwerp. Er zijn voldoende aanwijzingen dat MDR transporters laag-moleculaire verbindingen en peptiden met een molecuulgewicht <1kD kunnen transporteren. Of dit ook geldt voor chemokines en cytokines met hogere molecuulgewichten van respectievelijk tot 8 kD en tot 20 kD, is nog onduidelijk. In **hoofdstuk 8** onderzochten we of MDR transporters MRP1-5, P-gp en BCRP betrokken zijn bij de secretie van de chemokines CCL20, MCP1 en IL-8 en het cytokine TNF α . Hiertoe werden cellijnen met en zonder overexpressie van een specifieke MDR transporter gestimuleerd met de forbolester PMA en de calcium ionofoor ionomycine om de cellen aan te zetten tot de productie van chemokines en cytokines. Met behulp van specifieke blokkers voor de MDR transporters onderzochten wij of de chemokine en cytokine secretie veranderde ten opzicht van de conditie zonder blokkade. De resultaten lieten geen robuuste verschillen zien in CCL20, MCP1, IL-8 en TNF α secretie tussen geactiveerde cellijnen zonder specifieke MDR expressie en overeenkomstige cellijnen met een overexpressie van MRP2, 3, 4, 5 of BCRP. Ook het blokkeren van de transporters liet geen eenduidige effecten zien. Een interessante observatie was wel de verlaagde secretie van CCL20 na blokkering van MRP1 of P-gp. Echter, de resultaten waren sterk variabel tussen de verschillende cellijnen. Een laatste interessante bevinding was dat de activator van chemokine/cytokine productie, PMA, door P-gp uitgescheiden kon worden. Dit kan een ondersteuning zijn van de conclusie dat MDR transporters niet via een directe weg moleculen met een hoger molecuulgewicht transporteren maar eerder via een indirecte weg door transport van laag-moleculaire activator moleculen die chemokine/cytokine secretie induceren.

Experimentele geneesmiddelen met nieuwe werkingsmechanismen kunnen mogelijk worden gebruikt om de MDR-geassocieerde DMARD resistentie te omzeilen. Proteasoomremmers is een nieuwe klasse van experimentele geneesmiddelen die ingrijpt in het proces van de gecontroleerde afbraak van eiwitten. Het proteasoom speelt daarnaast ook een cruciale rol in de activatie van de transcriptie factor NF κ B door het afbreken van het I κ B α eiwit, de natuurlijke remmer van NF κ B. Geactiveerd NF κ B initieert de transcriptie van verschillende pro-inflammatoire cytokines zoals TNF α en IL-1 β . Proteasoomremmers bieden de mogelijkheid om de afbraak van het I κ B α eiwit te blokkeren, NF κ B activatie te blokkeren en een ontstekingsremmend effect te bewerkstelligen door het onderdrukken van de productie van pro-inflammatoire cytokines. In **hoofdstuk 9** hebben we de potentiële anti-inflammatoire eigenschappen geëvalueerd van bortezomib, een boron-bevattende dipeptide proteasoomremmer. Bortezomib is momenteel geregistreerd voor de behandeling van enkele hematologische maligniteiten. Conform de verwachting konden we aantonen dat bortezomib een snelle en krachtige remming van TNF α productie gaf in geactiveerde T-cellen van RA patiënten. Dit remmende effect werd ook aangetoond in T-cellen afkomstig van RA patiënten die niet meer reageerden op DMARD behandelingen. Naast een

verlaging van TNF α secretie, vertoonde bortezomib aanvullende effecten door het remmen van CD3/CD28 geïnduceerde T-cel activatie en, na > 48 uur blootstelling, een sterke inductie van geprogrammeerde celdood (apoptose) van perifere bloed lymfocyten van RA patiënten.

Ondanks de veelbelovende anti-inflammatoire werking van bortezomib is het onduidelijk wat de lange termijn werkzaamheid van dit middel zal zijn bij chronische toediening zoals naar verwachting noodzakelijk is voor de behandeling van RA patiënten. Bovendien is het onduidelijk of langdurige blootstelling aan bortezomib gepaard zal gaan met de ontwikkeling van resistentie tegen dit geneesmiddel. Om meer inzicht te verkrijgen in de mogelijke verworven resistentie voor bortezomib en de identificatie van de moleculaire basis hiervan hebben we in **hoofdstuk 10** humane monocyt/macrofaag THP1 cellen *in vitro* bloot gesteld aan een stapsgewijze toenemende concentratie van bortezomib (oplopend van 2.5 nM tot 200 nM). Bij selectie op deze laatste concentratie bleken cellen 129-maal minder gevoelig te zijn voor bortezomib dan de oorspronkelijke cellen. Onderzoek naar het moleculaire mechanisme van bortezomib-resistentie in deze cellen resulteerde in twee belangrijke bevindingen: (1) een mutatie in het PSMB5 gen coderend voor het proteasoom β 5 subunit eiwit van het 26S proteasoom, de primaire target van bortezomib. Deze mutatie heeft geresulteerd in een vervanging van het aminozuur alanine door threonine op positie 49 (Ala49Thr) van het β 5-subunit eiwit. Deze positie speelt een cruciale rol in de binding van bortezomib in het actieve centrum van de β 5 subunit van het proteasoom. (2) Een markante en selectieve overexpressie (tot 60 maal) van het PSMB5 eiwit werd waargenomen, maar niet van de twee andere katalytisch actieve proteasoom subunits PSMB6 en PSMB7 of van een van de niet-katalytische α -subunits van het proteasoom, PSMA7. Daarnaast vertoonden bortezomib-resistente cellen een hoge mate van kruisresistentie tegen andere β 5-subunit gerichte cytotoxische peptiden, waaronder 4A6, MG132, MG262 en ALLN. Volledige gevoeligheid bleef wel behouden voor alle DMARDs en een breed spectrum van antikankergeneesmiddelen. Bortezomib gevoeligheid in bortezomib-resistente cellen kon worden hersteld door siRNA-gemedieerde onderdrukking van PSMB5 genexpressie waarmee de opregulatie van het β 5 subunit eiwit voorkomen kon worden. Concluderend toonde deze studie aan dat er met resistentie ontwikkeling rekening moet worden gehouden bij een eventuele toekomstige toepassing van proteasoomremmers als nieuwe experimentele medicatie bij RA behandeling.

Bortezomib is de eerste klinisch beschikbare proteasoomremmer. Doorlopend onderzoek richt zich op het ontwerpen, identificeren en evalueren van tweede generatie proteasoomremmers. Deze nieuwe proteasoomremmers beschikken mogelijk over superieure eigenschappen ten opzichte van bortezomib. De nieuwe generatie pro-

teasoomremmers kan een irreversibele remming van het proteasoom bewerkstelligen daar waar bortezomib een reversibele proteasoomremmer is. Daarnaast kunnen nieuwe generatie proteasoomremmers aangrijpen op andere katalytisch actieve proteasoom subunits en daarmee de mogelijkheid bieden om bortezomib resistentie te omzeilen. In **hoofdstuk 11** beschrijven we een cytotoxisch peptide, 4A6, met een onbekend werkingsmechanisme. Omdat bortezomib-resistente cellen een markante kruisresistentie bleken te vertonen voor 4A6, was dit een aanwijzing dat 4A6 mogelijk een proteasoomremmer zou kunnen zijn. Na uitgebreidere karakterisering bleek inderdaad dat 4A6 een krachtige, selectieve en reversibele remmer van het proteasoom $\beta 5$ subunit is. Daarnaast vertoonde 4A6 differentiële activiteit tegen diverse leukemische en borstkanker cellijnen. Een nadeel is echter dat de activiteit van 4A6 beperkt kan worden door het feit dat het een substraat is voor de MDR transporters P-gp en MRP1. Desalniettemin mag 4A6 worden beschouwd als een prototype experimenteel geneesmiddel om door te ontwikkelen tot een nieuwe proteasoomremmer zonder affiniteit voor MDR transporters maar met een onstekingsremmende werking die op de lange termijn voor therapeutische doeleinden geschikt gemaakt kan worden.

Kernpunten van het proefschrift

Preklinisch / in-vitro laboratorium studies:

- Verworven resistentie tegen de DMARD chloroquine wordt is gemedieerd door een verhoogde cellulaire uitscheiding van deze DMARD, veroorzaakt door een verhoogde expressie van MRP1 (multidrug resistentie-geassocieerd eiwit 1).
- Chloroquine resistentie gaat gepaard met een markante kruisresistentie tegen glucocorticoïden, veroorzaakt door de onderdrukking van de cyclisch AMP-proteïne kinase A signaaltransductieroute.
- Sulfasalazine en methotrexaat kunnen geneesmiddelinteracties vertonen doordat sulfasalazine een krachtige remmer is van de cellulaire opname van methotrexaat via de gereduceerde folaat carrier. Hierdoor kunnen additieve/synergistische effecten van deze DMARD combinatie beperkt worden.
- Chronische blootstelling aan sulfasalazine induceert gevoeligheid van immuun-effector cellijnen voor glucocorticoïden.

- Multidrug resistentie transporters kunnen indirect betrokken zijn bij de secretie van chemokines en cytokines door middel van de uitscheiding van (kleine) activator moleculen die bij dit proces betrokken zijn.
- Verworven resistentie tegen de proteasoom remmer bortezomib wordt veroorzaakt door een Ala49Thr mutatie in het sterk geconserveerde bortezomib-bindende gebied van het proteasoom β 5-subunit (PSMB5) eiwit.

Klinisch-gericht laboratoriumonderzoek:

- Multidrug resistentie transporters zijn bekend met betrekking tot hun farmacologische rol in het veroorzaken van resistentie tegen geneesmiddelen. Hun fysiologische rol in immuun-gerelateerde cellen kan als even belangrijk worden beschouwd voor een optimaal functioneren van het immuunsysteem immuunfunctie.
- Verhoogde expressie van specifieke multidrug resistentie transporters in perifere bloedcellen en synoviale macrofagen lijkt eerder een ziekte-activiteit gerelateerd verschijnsel te zijn dan een DMARD-geïnduceerde effect.
- De MDR transporter BCRP komt markant tot expressie op macrofagen in het synoviale weefsel en kan verantwoordelijk zijn voor een verminderde effectiviteit van de DMARDs methotrexaat, leflunomide en sulfasalazine, alle drie substraten van BCRP.
- De proteasoomremmer bortezomib is zeer effectief in het onderdrukken van de secretie van ontstekingstimulerende cytokines door geactiveerde T-cellen van RA patiënten.